

Pemetaan Genetik Virus Avian Influenza di Indonesia 2007

NLP Indi Dharmayanti, R. Indriani, R Hartawan, D.A Hewajuli,
A. Ratnawati & Darminto

Balai Besar Penelitian Veteriner, JL RE Martadinata 30, BOGOR

ABSTRACT

Genetic Mapping of Indonesian Avian Influenza Viruses 2007. Department of agriculture implements vaccination as one a tool to control of avian influenza disease. The vaccination program use virus seed such as H5N1, H5N2 and H5N9. Such as vaccination program for other diseases, avian influenza vaccine program have lack implementation in the field. In 2007, department of agriculture evaluated the AI vaccination program such as the master seed vaccine that can be used. Result of the evaluation showed that 11 of AI vaccines that were distributed in Indonesia did not give protection more than 60% to Indonesian isolates in 2006 (A/Ck/Pwt-Wij/06). From this point and many AI cases in the field in 2007, the aim of this study was to conduct genetic diversity of avian influenza viruses which have circulated in Indonesia region. We used virus isolation for propagate the viruses, RT-PCR for identification and DNA sequencing on HA1 region to analysis genetic diversity for genetic mapping and useful for master seed candidate. The result of the study showed that there were 6 group of genetic diversity in 2007; Isolates from group 1, 5 and 6 can be used for AI vaccine candidate.

Key words: genetic mapping, genetic diversity and avian influenza viruses

PENDAHULUAN

Virus influenza menginfeksi berbagai macam jenis unggas, manusia dan beberapa jenis mamalia seperti babi, kucing, anjing, kuda, dan mamalia laut. Unggas air diduga sebagai sumber penularan semua virus AI kepada jenis hewan lainnya (Harimoto & Kawaoka, 2006). Virus Influenza adalah famili *Orthomyxoviridae* yang diklasifikasikan sebagai tipe A, B dan C berdasarkan perbedaan antigenik pada nucleoprotein (NP) dan protein matrix (M1). Virus

influenza tipe A selanjutnya di kelompokkan berdasarkan antigenisitas dari dua glikoprotein permukaan yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Sampai sekarang telah berhasil diidentifikasi 16 subtipe HA dan 9 subtipe NA (Wright & Webster 2001; Fouchier *et al.*, 2005)

Di Indonesia, Wiyono *et al.* (2004) dan Dharmayanti *et al.* (2004) mengidentifikasi virus AI pada tahun 2003 telah menginfeksi peternakan ayam petelur di Jawa Timur dan Jawa Barat. Sampai sekarang virus AI masih

merupakan masalah serius dan telah menjadi penyakit endemis di peternakan ayam serta menjadi penyakit zoonosis pada manusia (Chotpitayasunondh *et al.* 2005; Hien *et al.* 2004, Puthavathana *et al.* 2005). Berbagai macam pengendalian dan pencegahan terhadap infeksi virus AI telah banyak dilakukan, diantaranya dengan melakukan vaksinasi pada unggas. Beberapa vaksin yang digunakan diantaranya menggunakan seed virus H5N1, H5N2 dan H5N9.

Wabah AI pada tahun pertama penggunaan vaksin 2004 menunjukkan keberhasilan dalam menekan terjadinya wabah AI di Indonesia. Namun demikian seperti halnya program vaksinasi lainnya, program vaksinasi AI mengalami banyak hambatan, mulai dari terbatasnya jumlah vaksin dan sulitnya implementasi di lapangan untuk peternakan ayam di sektor 4, kesulitan melakukan vaksinasi, belum adanya program vaksin AI yang optimal dan terdapatnya kegagalan vaksinasi pada beberapa peternakan sektor 1, 2 dan 3

Program vaksinasi AI 2007 dievaluasi oleh pemerintah dalam hal ini Departemen Pertanian. Hasil dari evaluasi tersebut diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Swayne (2007) yaitu uji tantang dengan virus AI lapang tahun 2006 yaitu A/Ck/West Java/Pwt-Wij/06 terhadap 11 vaksin yang beredar di Indonesia. Virus yang digunakan oleh Swayne merupakan virus AI yang berasal dari peternakan ayam petelur yang melakukan vaksinasi AI. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa tidak ada satupun vaksin yang diuji dapat memproteksi akibat virus tersebut lebih

dari 60%.

Sifat virus AI yang mudah mutasi, diantaranya dengan melakukan *antigenic drift* dan *antigenic shift*, menyebabkan virus ini telah berubah karakter genetiknya pada tahun 2003. Penelitian Dharmayanti & Darminto (2007) tentang berubahnya virus AI pada tingkat genetik pada tahun 2006, menyebutkan bahwa terdapat 2 virus AI yang merupakan virus *escape mutan* (kemungkinan besar akibat terjadinya tekanan imunologis yang diterima).

Sehubungan dengan itu kami telah menganalisis adanya virus *escape mutan* yang berasal dari peternakan ayam petelur yang melakukan vaksinasi 2007. Dari kasus AI dilapang dan beberapa penelitian yang telah dilakukan, maka pemetaan genetik virus AI perlu dilakukan untuk mengetahui keragaman dan karakter penyebaran genetik virus AI di Indonesia, terutama pada tahun 2007. Selanjutnya data genetik tersebut digunakan untuk mengevaluasi atau menentukan seed vaksin yang akan digunakan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Virus AI

Sejumlah 62 isolat virus AI yang digunakan untuk studi ini berasal dari virus AI koleksi Bbalitvet, BPPV Medan, BPPV Bukittinggi, BPPV Lampung, BPPV Banjarbaru, BBVet Wates, BBVet Denpasar dan BBVet Maros. Daftar virus AI yang digunakan dalam penelitian ini dan telah diidentifikasi oleh masing-masing institusi tersebut di atas sebagai virus avian influenza subtype H5,

dapat dilihat pada tabel 1.

Virus AI ini kemudian dilakukan propagasi pada telur *specific pathogen free* (SPF) umur 9-11 hari serta diidentifikasi ulang dengan menggunakan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dengan menggunakan set primer AI subtype H5 dengan menggunakan set primer sesuai Lee *et al.* (2001). Isolat virus yang dapat ditumbuhkan di telur SPF yang akan dianalisa lebih lanjut. Studi

ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Virologi, Bbalitvet, JL RE Martadinata 30, Bogor.

Ekstraksi RNA dan RT-PCR subtype H5

Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan QIAmp RNA viral mini kit sesuai dengan instruksi penggunaan dengan sedikit modifikasi. Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *Superscript III one step RT-PCR system*

Tabel 1. Daftar isolat virus avian influenza yang digunakan dalam penelitian

No	Asal Isolat	Nama Isolat Virus AI
1	BBalitvet	A/Ck/West Java/Smi-app2/2007; A/Goose/West Java/Smi-Sdrj2/2007; A/Central Java/ Mglg-Muhs2/2007; A/Env/East Java/Tlg-ar2/2007; A/Ck/East Java/Tlg-Jt15_2/2007; A/Quail/East Java/Mlg-py_2/2007; A/Ck/Jakarta/walkt1_2/2007; A/Ck/Jakarta/ wat2/2007; A/West Java/Smi-Sud1/2007; A/West Java/Smi-HJ18/2007; A/Ck/Banten/ Tgrg-Sud2/2007; A/Ck/Banten/Tgrg-Sud3A/2007; A/Env/Indonesia/PSP626/2007; A/Env/Indonesia/PSP65/2007
2	BBVet Denpasar	A/Ck/BBVet-Denpasar/545/2007; A/Ck/BBVet-Denpasar/458/2007; A/Ck/BBVet-Denpasar/560/2007; A/Dk/Tabanan-BBVet-Denpasar/100/2007
3	BBVet Wates	A/Ck/Karanganyar/282/V/2007 (Layer); A/Quail/Trenggalek/325/VI/2007; A/Ck/Sleman/626/VIII/2007(Backyard Chicken); A/Ck/Sleman/722/X/2007
4	BBPV Medan	A/Duck/Kulon Progo/984/XII/2007; A/Swan/Sleman/1002/XII/2007; A/Quail/Deli/BPPVI-232/07; A/Ck/Medan/BPPVI-006/07; A/Dk/Tebingtinggi/BPPVI-158/07; A/Ck/Nias/BPPVI-399/07; A/Ck/Bireun/BPPVI-079/07
5	BPPV Lampung	A/Ck/WYK/BPPV3/2007; A/Ck/MEN/BPPV3/2007; A/Ck/RJL/BPPV3/2007
6	BPPV Bukittinggi	A/Ck/Pessel/BPPVRII/2007; A/Ck/50 Kota/BPPVRII/2007; A/Ck/Padang/BPPVRII/2007; A/Ck/Dharmasraya/BPPVRII/2007; A/Ck/Solok Selatan/BPPVRII/2007; A/Ck/Padang Pariaman/BPPVRII/ 2007; A/Ck/Agam/BPPVRII/2007; A/Ck/Sawahlunto/BPPVRII/2007; A/Ck/Payakumbuh/BPPVRII/2007; A/Quail/Agam/BPPVRII/2007; A/Ck/Pariaman/BPPVRII/2007; A/Ck/Tanah Datar/BPPVRII/2007; A/Ck/Sarolangun/BPPVRII/2007; A/Ck/Inhil/BPPVRII/2007; A/Ck/Bengkalis/BPPVRII/2007; A/Ck/Siak/BPPVRII/2007; A/Ck/Batam/BPPVRII/2007; A/Soil/Pekanbaru/BPPVRII/2007; A/Ck/Pekanbaru/BPPVRII/2007; A/Ck/Inhu/BPPVRII/2007; A/Ck/50Kota/BPPVRII/2007; A/Dk/Bengkalis/BPPVRII/2007
7	BPPV Banjarbaru	147/5/07; 148/5/07; 149/5/07; 169/6/07; 188/7/07; 198/7/07
8	BBVet Maros	A/Ck/TanaToraja/BBVM/595/2007; A/Ck/Maros/BBVM/44(17)/2008

(invitrogen).

DNA Sekuensing

Strategi dan set primer untuk mengamplifikasi gen HA1 sesuai dengan Senne *et al.* (1996) yang di modifikasi. Primer yang digunakan dalam pengujian ini adalah 4 pmol/ μ l. Siklus sekuensing menggunakan *Big Dye Terminator v 3.1* dan DNA sekuensing dilakukan dengan mesin *Applied Biosystem (ABI) 3130*. Data sekuen nukleotida yang diperoleh dikompilasi dan ditranslasi dengan menggunakan BioEdit, *multiple alignment* dianalisis dengan ClustalW dan phylogenetik dihasilkan dengan MEGA 3.1. Data asam amino HA1 yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan data sekuen AI dari NCBI. Data sekuen virus AI dari NCBI yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

HASIL

Isolasi dan Identifikasi Virus AI

Hasil identifikasi ulang dengan menggunakan set primer dari Lee *et al.* (2001) menunjukkan 62 isolat AI dapat diamplifikasi dengan menggunakan primer tersebut yang menunjukkan ampikon pada posisi 500-600 pasangan basa (*base pairs*, bp). Namun demikian dari 62 isolat yang positif sub tipe H5, hanya 52 isolat yang dapat ditumbuhkan pada telur SPF. Hal ini kemungkinan disebabkan karena 10 virus tersebut sudah mati akibat transportasi dari daerah sampai ke laboratorium virologi di Bbalitvet, Bogor.

Analisis Keragaman Genetik Virus AI 2007

Untuk mengamplifikasi daerah gen HA1 dilakukan *One Step RT-PCR* dengan menggunakan primer Senne *et al.* (1996). Hasil amplifikasi menunjukkan ampikon di posisi 1100 pasangan basa. Daerah ampikon ini mencakup daerah *cleavage site* gen HA.

Setelah dilakukan sekuensing dan dianalisa, sekuen asam amino di daerah *cleavage site* masih menunjukkan virus *highly pathogenic* avian influenza dengan ditandai oleh adanya *multiple basic* asam amino di daerah ini (Tabel 3). Nama isolat AI pada Tabel 3 (No. 27-69) adalah nama isolat yang digunakan dalam penelitian ini, sedangkan Tabel 3 (No 1-26) adalah data isolat AI dari NCBI (lihat tabel 2). Warna merah pada posisi -6 HA1 adalah lokasi terjadinya substitusi asam amino pada isolat AI.

Data sekuen asam amino virus AI ini kemudian dibandingkan untuk mengetahui sejauh mana telah terjadi perubahan pada urutan sekuen asam amino tersebut. Pada Gambar 1 dapat dilihat perbandingan gen HA1 dengan menggunakan virus AI yang dianalisa pada studi ini dengan data sekuen asam amino yang diperoleh dari NCBI tahun 2006-2007. Hasil *multiple alignment* dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil analisa *Phylogenetic tree* menunjukkan terdapatnya 6 kelompok keragaman genetik yang ada di Indoensia pada isolat AI 2007 (Gambar 2). Gambar 3 menunjukkan penyebaran genetik virus AI 2007 di Indonesia. Warna ungu merupakan kelompok 6 yang hanya dijumpai di Sumatra, Kalimantan

Tabel 2. Data isolat virus AI dari NCBI

No	Nama Isolat virus AI	No Accession NCBI
1	A/Ck/Indonesia/Lampung1631-23/2006	EU124205
2	A/Ck/Indonesia/Kulon1631-47/2006	EU124209
3	A/Ck/Indonesia/Bandung1631-49/2006	EU124210
4	A/Ck/Indonesia/Garut1631-51/2006	EU124211
5	A/Ck/Indonesia/Pekenbaru1631-11/2006	EU124200
6	A/Ck/Indonesia/Siak1631-2/2006	EU124197
7	A/Ck/Indonesia/Padang1631-1/2006	EU124196
8	A/Ck/Indonesia/Agam1631-3/2006	EU124198
9	A/Ck/Indonesia/Soppeng1631-71/2007	EU124215
10	A/Ckn/Indonesia/Semarang1631-62/2007	EU124214
11	A/Ck/Indonesia/Magelang1631-57/2007	EU124212
12	A/Ck/West Java/HAMD/06	EU124163
13	A/Ck/West Java/TASIK1/06	EU124155
14	A/Ck/West Java/TASIK2/06	EU124154
15	A/Ck/West Java/GARUT-MAY/2006	EU124153
16	A/Ck/West Java/TASIKSOL/2006	EU124151
17	A/Ck/West Java/SMI-CSLK-EC/2006	EU124150
18	A/Ck/West Java/PWT-WIJ/2006	EU124148
19	A/Indonesia/7/2005	EU146632
20	A/Indonesia/286H/2006	EU146688
21	A/Indonesia/CDC1047/2007	CY019424
22	A/Indonesia/CDC1046/2007	CY019408
23	A/Indonesia/CDC1031RE2/2007	CY019376
24	A/Indonesia/CDC699/2006	CY014497
25	A/Indonesia/CDC595/2006	CY014280
26	A/Indonesia/CDC594/2006	CY014272

dan Sulawesi. Warna kuning dan hijau merupakan kelompok 1 dan 4 yang hanya dijumpai di wilayah Jawa Barat, Banten dan Jakarta.

PEMBAHASAN

Karakter Molekuler Virus AI tahun 2007

Karakter molekuler virus AI telah mengalami perubahan yang cukup dinamis, sejak terjadinya wabah penyakit ini pada tahun 2003. Penelitian Smit *et al.* (2006) menyebutkan bahwa sebagian besar virus yang berasal dari Indonesia mempunyai motif *multiple basic* asam amino pada daerah *cleavage site* yang

merupakan karakter dari virus highly pathogenic avian influenza (HPAI) yaitu QRERRRKKR//G. Dua virus dari Indonesia yaitu A/Ck/Kulonprogo/BBVet-XII-1/04 dan A/Ck/Kulonprogo/BBVet-XII mempunyai sebuah delesi pada asam amino di cleavage sitenya yaitu Lysin (QRERRRKKR//G). Dharmayanti & Indriani (2007) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa virus AI tahun 2005 telah mengalami mutasi yang cukup signifikan. Analisis phylogenetik menunjukkan bahwa terdapat 3 kelompok yang berbeda, dan virus A/Ck/Jakarta/DKI-III/2005 merupakan isolat yang tidak mempunyai kekerabatan dekat dengan isolat Indonesia lainnya.

Tabel 3. Sekuen asam amino di daerah *cleavage site* Gen HA isolat AI Indonesia 2007

No	ISOLAT VIRUS AI	CLEAVAGE SITE													
		HA1													HA2
1	A/Ck/Indonesia/Lampung1631-23/	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
2	A/Ck/Indonesia/Kulon1631-47/20	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
3	A/Ck/Indonesia/Bandung1631-49/	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
4	A/Ck/Indonesia/Garut1631-51/20	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
5	A/Ck/Indonesia/Pekenbaru1631-1	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
6	A/Ck/Indonesia/Siak1631-2/2006	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
7	A/Ck/Indonesia/Padang1631-1/20	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
8	A/Ck/Indonesia/Agam1631-3/2006	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
9	A/Ck/Indonesia/Soppeng1631-71/	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
10	A/Ckn/Indonesia/Semerang1631-6	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
11	A/Ck/Indonesia/Magelang1631-57	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
12	A/Ck/West Java/HAMD/06	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F	
13	A/Ck/West Java/TASIK1/06	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
14	A/Ck/West Java/TASIK2/06	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
15	A/Ck/West Java/GARUT-MAY/20	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F	
16	A/Ck/West Java/TASIKSOL/2006	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
17	A/Ck/West Java/SMI-CSLK-EC/200		P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F
18	A/Ck/West Java/PWT-WIJ/2006	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
19	A/Indonesia/7/2005	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
20	A/Indonesia/286H/2006	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
21	A/Indonesia/CDC1047/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
22	A/Indonesia/CDC1046/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
23	A/Indonesia/CDC1031RE2/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
24	A/Indonesia/CDC699/2006	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
25	A/Indonesia/CDC595/2006	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F	
26	A/Indonesia/CDC594/2006	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F	
27	A/Ck/West Java/Smi-app2/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
28	A/Goose/West Java/Smi-Sdrj2/20	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
29	A/Central Java/Mglg-Muhs2/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
30	A/Env/East Java/Tlg-ar2/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
31	A/Ck/East Java/Tlg-Jt15_2/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
32	A/Quail/East Java/Mlg-py_2/200	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
33	A/Ck/Jakarta/walkt1_2/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
34	A/Ck/Jakarta/wat2/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
35	A/West Java/Smi-Sud1/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
36	A/West Java/Smi-HJ18/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
37	A/Ck/Banten/Tgrg-Sud2/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
38	A/Ck/Banten/Tgrg-Sud3A/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
39	A/Env/Indonesia/PSP626/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
40	A/Env/Indonesia/PSP65/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
41	A/Ck/Batam/BPPVR1I/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
42	A/Ck/Inhil/BPPVR1I/2007	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
43	A/Ck/Pekanbaru/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
44	A/Ck/50 Kota/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
45	A/Ck/Inhu/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
46	A/Ck/Solok Selatan/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
47	A/Ck/padang/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
48	A/Ck/Padang Pariaman/BPPVR1I/0	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
49	A/Dk/Bengkalis/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
50	A/Ck/Payakumbuh/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
51	A/Ck/Sarolangun/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
52	A/Ck/50Kota/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F	
53	A/Ck/Pariaman/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
54	A/Ck/Agam/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	
55	A/Ck/Pesse/BPPVR1I/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F	

Tabel 3. Lanjutan 1

No	ISOLAT VIRUS AI	CLEAVAGE SITE												
		HA1												
56	A/Ck/BBVet-Denpasar/545/07	P	Q	R	E	R	R	K	K	R	G	L	F	
57	A/Ck/BBVet-Denpasar/458/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F
58	A/Dk/Tabanan-BBVet-Denpasar/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
59	A/Ck/Karanganyar/282/V/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F
60	A/Quail/Trenggalek/325/VI/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F
61	A/Ck/Sleman/722/X/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F
62	A/Duck/Kulon Progo/984/XII/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
63	A/Ck/Bireun/BPPV1-079/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
64	A/Dk/Tebingginggi/BPPV1-158/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F
65	A/Ck/Nias/BPPV1-399/07	P	Q	R	E	G	R	R	K	K	R	G	L	F
66	A/Quail/Deli/BPPV1-232/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
67	A/Ck/Medan/BPPV1-006/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
68	A/Ck/RJL/BPPV3/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F
69	A/Ck/MEN/BPPV3/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F
70	A/Ck/WYK/BPPV3/07	P	Q	R	E	S	R	R	K	K	R	G	L	F
71	BB149/5/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
72	BB198/7/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
73	BB147/5/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
74	BB148/5/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
75	BB169/6/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
76	BB188/7/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
77	A/Ck/TanaToraja/BBVM/595/07	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F
78	A/Ck/Maros/BBVM/44(17)/08	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	R	G	L	F

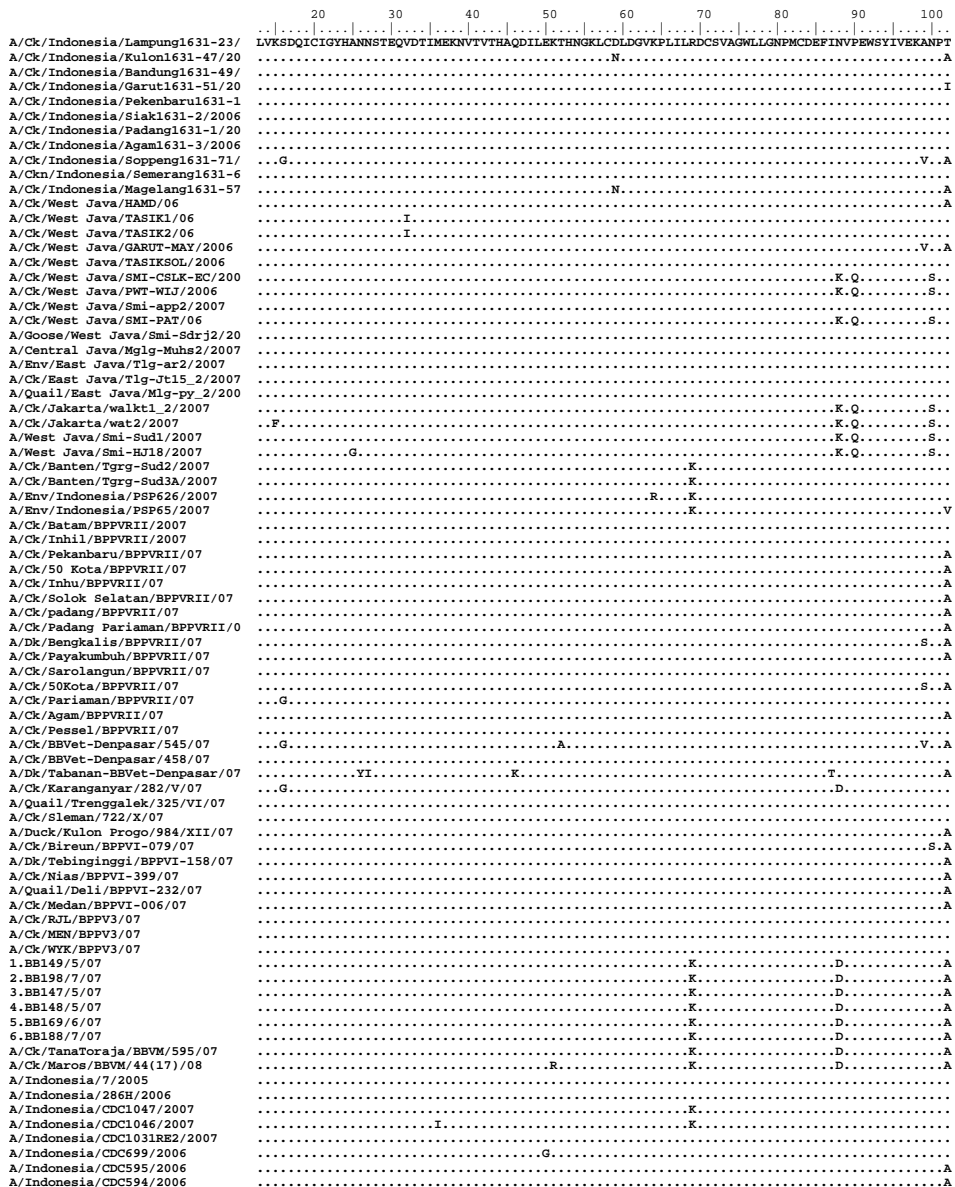
Homologi antara isolat Indonesia yang dibandingkan adalah sekitar 91-96%. Sekuen asam amino di *cleavage site* yang merupakan petanda patogenisitas virus AI menunjukkan sebagian besar mempunyai motif *multiple basic* asam amino yaitu PQRERRRKKR//G kecuali satu isolat mempunyai motif seperti motif sekuen di *cleavage site* dari virus AI yang mengakibatkan fatal pada manusia yaitu PQRESRRKKR//G.

Pada penelitian ini semua isolat koleksi 2007 menunjukkan *multiple basic amino acid* pada *cleavage site* gen HA yang menunjukkan virus HPAI. Namun demikian sebagian besar isolat menunjukkan perubahan asam amino Arginin menjadi Serin (R-S) pada posisi -6 (PQRESRRKKR//G), sedangkan sepuluh isolat yang berasal dari BPPV

Bukittinggi dan 2 isolat dari BPPV Medan menunjukkan perubahan asam amino RàG (PQREGRRKKR/G). Semua isolat yang berasal dari BPPV Banjarbaru dan Maros tidak mengalami perubahan asam amino pada posisi tersebut. Semua virus 2007 yang dianalisis pada penelitian ini masih mengenal *avian receptor* (α 2,3), tidak mengalami perubahan pada *pocket receptor binding site* (Ha *et al.*, 2001).

Keragaman Genetik Virus AI

Beberapa publikasi menyebutkan bahwa analisis genetik sebagian besar virus H5N1 yang berasal dari unggas dan manusia dari negara Asia memiliki dominan genotipe Z yang pertama kali ditemukan di China Selatan tahun 2002 (Guan *et al.* 2004; Li *et al.* 2004;



Gambar 1. Multiple alignment hemagglutinin (HA1) virus AI tahun 2006-2007

[illegible]

163

	200	210	220	230	240	250	260	270	280					
A/Ck/Indonesia/Lampung1631-23/	GIHPNDAAEQ	TRL	YQNPTT	YISIGT	STLNQRLV	FKIATRSK	VNGQS	GRMEFF	FWTILK	PNDAINFES	NGNFIAE	FEYAKI	VKKGDS	AIKMK
A/Ck/Indonesia/Kulon1631-47/20														
A/Ck/Indonesia/Bandung1631-49/														
A/Ck/Indonesia/Garut1631-51/20														
A/Ck/Indonesia/Pekanbaru1631-1														
A/Ck/Indonesia/Siak1631-2/2006														
A/Ck/Indonesia/Padang1631-1/20														
A/Ck/Indonesia/Agam1631-3/2006														
A/Ck/Indonesia/Soppengl1631-71/														
A/Ckn/Indonesia/Semerang1631-6														
A/Ck/Indonesia/Megalang1631-57														
A/Ck/West Java/HMD/06														
A/Ck/West Java/TASIK1/06														
A/Ck/West Java/TASIK2/06														
A/Ck/West Java/GARUT-MAY/2006														
A/Ck/West Java/TASIKSOL/2006														
A/Ck/West Java/SMI-CSLK-EC/200														
A/Ck/West Java/PWT-WIJ/2006														
A/Ck/West Java/Smi-app2/2007														
A/Ck/West Java/SMI-PAT/06														
A/Goose/West Java/Smi-Sdrj2/20														
A/Central Java/Mgig-Muhs2/2007														
A/Env/East Java/Tlg-ar2/2007														
A/Ck/East Java/Tlg-Jt15_2/2007														
A/Quail/East Java/Mlg-py_2/200														
A/Ck/Jakarta/walht1_2/2007														
A/Ck/Jakarta/West2/2007														
A/West Java/Smi-Sud1/2007														
A/West Java/Smi-HJ18/2007														
A/Ck/Banten/Tgrg-Sud2/2007														
A/Ck/Banten/Tgrg-Sud3A/2007														
A/Env/Indonesia/PSP626/2007														
A/Env/Indonesia/PSP65/2007														
A/Ck/Batam/BPPVR11/2007														
A/Ck/Inh1/BPPVR11/2007														
A/Ck/Pekanbaru/BPPVR11/07														
A/Ck/50 Kota/BPPVR11/07														
A/Ck/Inhu/BPPVR11/07														
A/Ck/Solok Selatan/BPPVR11/07														
A/Ck/padang/BPPVR11/07														
A/Ck/Padang Pariaman/BPPVR11/0														
A/Dk/Bengkalis/BPPVR11/07														
A/Ck/Payakumbuh/BPPVR11/07														
A/Ck/Sarolangun/BPPVR11/07														
A/Ck/50Kota/BPPVR11/07														
A/Ck/Pariaman/BPPVR11/07														
A/Ck/Agam/BPPVR11/07														
A/Ck/Pessel/BPPVR11/07														
A/Ck/BBVet-Denpasar/545/07														
A/Ck/BBVet-Denpasar/458/07														
A/Dk/Tabanan-BBVet-Denpasar/07														
A/Ck/Karanganyar/282/V/07														
A/Quail/Trenggalek/325/VI/07														
A/Ck/Sleman/722/X/07														
A/Duck/Kulon Progo/984/XII/07														
A/Ck/Bireun/BPPVI-079/07														
A/Dk/Tebtingggi/BPPVI-158/07														
A/Ck/Nias/BPPVI-339/07														
A/Quail/Deli/BPPVI-232/07														
A/Ck/Medan/BPPVI-006/07														
A/Ck/RJTJ/BPPV3/07														
A/Ck/MEN/BPPV3/07														
A/Ck/WYK/BPPV3/07														
1.BB149/5/07														
2.BB198/7/07														
3.BB147/5/07														
4.BB148/5/07														
5.BB169/6/07														
6.BB188/7/07														
A/Ck/TanaToraja/BBVM/595/07														
A/Ck/Maros/BBVM/44(17)/08														
A/Indonesia/7/2005														
A/Indonesia/2868/2006														
A/Indonesia/CDC1047/2007														
A/Indonesia/CDC1046/2007														
A/Indonesia/CDC1031RE2/2007														
A/Indonesia/CDC699/2006														
A/Indonesia/CDC595/2006														
A/Indonesia/CDC594/2006														

Pemetaan Genetik Virus Avian Influenza di Indonesia 2007

	290	300	310	320	330	340
A/Ck/Indonesia/Lampung1631-23/	SELEYGNCNTKCT	TPMGAINSSMPF	NIHPLTIGEC	PKYVKSRLVL	ATGLRNSPQR	ESRRKKKG
A/Ck/Indonesia/Kulon1631-47/20						
A/Ck/Indonesia/Bandung1631-49/						
A/Ck/Indonesia/Garut1631-51/20						
A/Ck/Indonesia/Pekanbaru1631-1						
A/Ck/Indonesia/Siak1631-2/2006						
A/Ck/Indonesia/Padang1631-1/20						
A/Ck/Indonesia/Agam1631-3/2006						
A/Ck/Indonesia/Soppeng1631-71/						R
A/Ckn/Indonesia/Semerang1631-6						
A/Ck/Indonesia/Magelang1631-57						R
A/Ck/West Java/HAMD/06						R
A/Ck/West Java/TASIKI/06						
A/Ck/West Java/TASIK2/06						R
A/Ck/West Java/GARUT-MAY/2006						
A/Ck/West Java/TASIKSOL/2006						
A/Ck/West Java/SMI-CSLK-EC/200		D				
A/Ck/West Java/PWT-WIJ/2006		D				
A/Ck/West Java/Smi-app2/2007						
A/Ck/West Java/SMI-PAT/06		D				
A/Goose/West Java/Smi-Sdrj2/20						
A/Central Java/Mg1g-Muhs2/2007		V			N	
A/Env/East Java/Tlg-ar2/2007						
A/Ck/East Java/Tlg-Jt15_2/2007						
A/Quail/East Java/Mlg-py_2/200						
A/Ck/Jakarta/walkt1_2/2007		D				
A/Ck/Jakarta/wat2/2007		D				
A/West Java/Smi-Sudi/2007		D				
A/West Java/Smi-HJ18/2007						
A/Ck/Banten/Tgrg-Sud2/2007						
A/Ck/Banten/Tgrg-Sud3a/2007						
A/Env/Indonesia/PSp626/2007						
A/Env/Indonesia/PSp65/2007						
A/Ck/Batam/BPPVRII/2007		S			S	
A/Ck/Inh1/BPPVRII/2007						
A/Ck/Pekanbaru/BPPVRII/07						G
A/Ck/50 Kota/BPPVRII/07						G
A/Ck/Inhu/BPPVRII/07						G
A/Ck/Solok Selatan/BPPVRII/07						G
A/Ck/padang/BPPVRII/07					N	G
A/Ck/Padang Parliman/BPPVRII/0						G
A/Dk/Bengkalis/BPPVRII/07						G
A/Ck/Payakumbuh/BPPVRII/07						G
A/Ck/SaroLangun/BPPVRII/07					K	G
A/Ck/50Kota/BPPVRII/07						G
A/Ck/Pariaman/BPPVRII/07					K	
A/Ck/Agam/BPPVRII/07						G
A/Ck/Pessel/BPPVRII/07						
A/Ck/BBVet-Denpasar/545/07						R
A/Ck/BBVet-Denpasar/458/07						
A/Dk/Tabanan-BBVet-Denpasar/07					S	R
A/Ck/Karanganyar/282/V/07						
A/Quail/Trenggalek/325/VI/07						
A/Ck/Sleman/722/X/07						
A/Duck/Kulon Progo/984/XII/07						R
A/Ck/Bireun/BPPVI-079/07						R
A/Dk/Tebingtinggi/BPPVI-158/07						G
A/Ck/Nias/BPPVI-399/07						G
A/Quail/Deli/BPPVI-232/07						R
A/Ck/Medan/BPPVI-006/07						R
A/Ck/RJL/BPPV3/07						R
A/Ck/MEN/BPPV3/07						D
A/Ck/WYK/BPPV3/07						
1.BB149/5/07						R
2.BB198/7/07						R
3.BB147/5/07						R
4.BB148/5/07						R
5.BB169/6/07						R
6.BB188/7/07						R
A/Ck/TanaToraja/BBVM/595/07						K
A/Ck/Maros/BBVM/44(17)/08						K
A/Indonesia/7/2005						R
A/Indonesia/286H/2006						
A/Indonesia/CDC1047/2007		S			S	
A/Indonesia/CDC1046/2007		S			S	
A/Indonesia/CDC1031RE2/2007		S				
A/Indonesia/CDC699/2006						
A/Indonesia/CDC595/2006					L	R
A/Indonesia/CDC594/2006						R

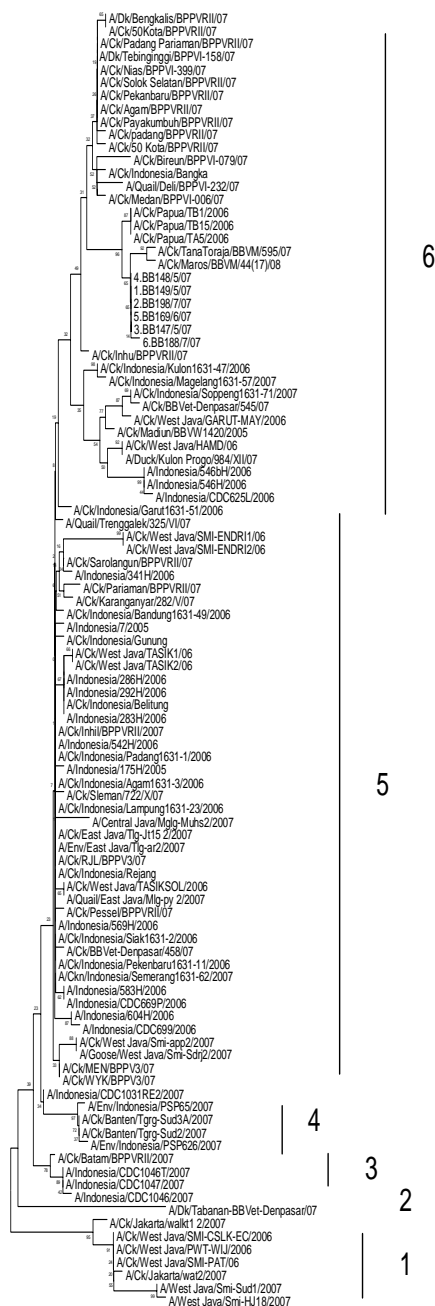
Gambar 1: Lanjutan

Puthavathana *et al.* 2005; WHO 2005). Karakteristik genetik virus H5N1 yang berasal dari Asia Tenggara dan China Selatan diidentifikasi mempunyai sejumlah residu asam amino pada HA dan tampaknya khas pada virus *clade* dari beberapa daerah, dan perbedaan ini terutama pada daerah antigenik dan *reseptor binding site* (WHO 2005).

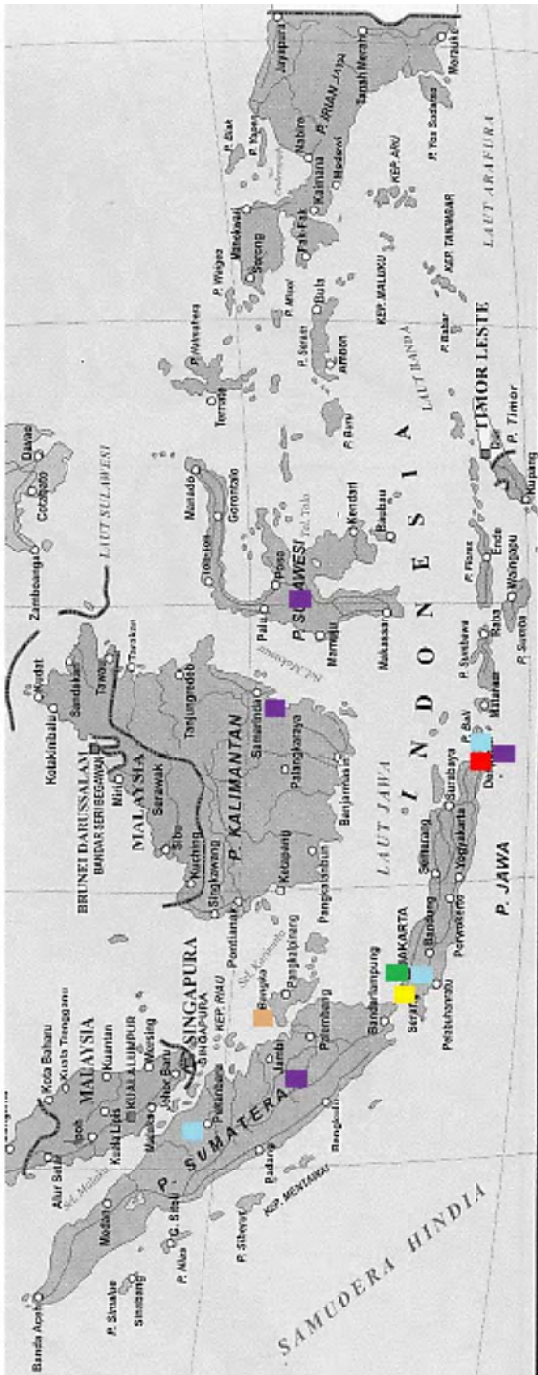
Pada Isolat Koleksi Bbalitvet tahun 2007 yaitu virus A/Ck/Jakarta/walkt1_2/2007; A/Ck/Jakarta/wat2/2007; A/West Java/Smi-Sud1/2007; A/West Java/Smi-HJ18/2007 mempunyai perbedaan yang cukup signifikan dibandingkan dengan isolat 2007 lainnya. Dua dari empat isolat ini yaitu A/West Java/Smi-Sud1/2007; A/West Java/Smi-HJ18/2007 mempunyai kemiripan asam amino dengan isolat tahun 2006 (A/west Java/Pwt-Wij/2006, A/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/West Java/Smi-Cslk-Ec/2006). Isolat A/West Java/Smi-Sud1/2007 dan A/West Java/Smi-HJ18/2007 merupakan isolat yang berasal dari peternakan layer yang melakukan vaksinasi AI, seperti halnya isolat pada tahun 2006 A/west Java/Pwt-Wij/2006 dan A/West Java/Smi-Pat/2006. Isolat A/Dk/Tabanan-BBVet-Denpasar/07 juga mempunyai perbedaan asam amino yang cukup signifikan dibandingkan dengan isolat yang berasal dari koleksi BBVet Denpasar dan isolate lainnya. Hal ini menarik karena virus ini bukan berasal dari ayam tetapi berasal dari itik, karena Dharmayanti & Darminto (2007) menyebutkan pada data sekuen asam amino HA pada tahun 2003-2006 yang dianalisa, itik tidak banyak menunjukkan perubahan asam amino jika dibandingkan dengan ayam.

Isolat Koleksi BPPV Banjarbaru (BB149/5/07, BB198/7/07, BB147/5/07, BB148/5/07, BB169/6/07, BB188/7/07 dan BBVet Maros (A/Ck/TanaToraja/BBVM/595/07, A/Ck/Maros/BBVM/44(17)/08) mempunyai kemiripan yang cukup besar dan berada dalam satu kelompok dengan isolat tahun 2006 yang berasal dari Papua (lihat gambar *phylogenetic tree*).

Smith *et al.* (2006) pada penelitiannya menyatakan bahwa dari 41 virus yang diisolasi di Indonesia pada tahun 2003-2006 terdapat tiga kelompok virus di Indonesia Kelompok A meliputi virus dari Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Selatan dan Timor Barat. Kelompok B juga terdiri dari isolate yang berasal dari Jawa, Bali dan Flores dan Timor Barat, sedangkan kelompok C meliputi Jawa, Sumatra dan Bangka. Hasil analisa *phylogenetic tree* menunjukkan bahwa terdapat enam kelompok keragaman genetik (*genetic diversity*) pada susunan asam amino HA1 yang dibandingkan (lihat gambar *phylogenetic tree*). Analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa hanya isolat yang berasal dari Bbalitvet terutama yang berasal dari flock tervaksinasi tahun 2007 (Kelompok 1) yang berasal dari Sukabumi yang berada dalam satu kelompok dengan virus dari flock tervaksinasi tahun 2006 (Dharmayanti & Darminto 2007). Kelompok 2 hanya terdiri dari virus A/Dk/Tabanan-BBVet-Denpasar/07 yang mengalami perbedaan cukup signifikan dengan isolat BBVet Denpasar dan isolat lainnya. Kelompok 3 terdiri dari kelompok virus AI yang berasal dari manusia dan isolat A/Ck/Batam/



Gambar 2. Phylogenetik tree hemagglutinin (HA1) virus AI Indonesia tahun 2006-2007



Gambar 3. Pemetaan Genetik virus AI tahun 2007 di Indonesia

- Keterangan :
- Kelompok 1 : Warna kuning
 - Kelompok 2 : Warna Merah
 - Kelompok 3 : Warna Coklat
 - Kelompok 4 : warna Hijau
 - Kelompok 5 : Warna Biru muda
 - Kelompok 6 : Warna Ungu

BPPVII/07, Kelompok 4 terdiri dari virus yang berasal dari lingkungan pasar dan isolat yang berasal dari flock ayam tervaksinasi yang berasal dari Tangerang. Dua kelompok besar yaitu kelompok 5 dan 6. Kelompok 5 terdiri dari isolat yang berasal dari koleksi Bbalitvet, BPPVBukittinggi, BBVet Wates, BPPV Lampung, dan BBVet Denpasar. Sedangkan kelompok 6 terdiri dari isolat koleksi BPPV Bukittinggi, BBVet Maros, BPPV Banjarbaru dan BPPV Medan. Hal ini menunjukkan bahwa virus AI secara cepat atau lambat akan terus berubah sehingga studi untuk mengetahui keragaman genetik virus AI yang bersirkulasi pada setiap tahun harus dilakukan, untuk mengantisipasi kemungkinan terjadinya mutasi yang berbahaya atau pandemi AI.

Dari data keragaman genetik virus AI 2006-2007 tersebut, telah diketahui terdapat enam kelompok variasi/karakter virus AI di Indonesia 2006-2007. Jika data ini digunakan untuk menentukan kandidat seed vaksin AI untuk unggas, maka setidaknya terdapat 3 kandidat virus AI yang bisa digunakan yaitu kelompok 1, 5 dan 6.

KESIMPULAN

Isolat virus AI 2007 menunjukkan 3 jenis motif urutan asam amino di daerah *cleavage site* yaitu PQRERRRKKR//G, PQRRESRRKKR//G, dan PQREGRRKKR//G dan semua virus tahun 2007 yang dianalisis pada penelitian ini masih mengenal *avian receptor* (α 2,3), tidak mengalami perubahan pada *pocket receptor binding site* (Ha *et al.* 2001)

serta setidaknya terdapat 3 kandidat virus AI yang bisa digunakan sebagai master seed vaksin yaitu kelompok 1,5 dan 6.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penghargaan terima kasih kepada semua kolega di BPPV Medan, Bukittinggi, Lampung, Banjarbaru, BBVet Wates, BBVet Maros dan BBVet Denpasar atas kontribusi isolat AI. Terima kasih juga diberikan kepada Bapak Nana Suryana, Teguh Suyatno dan Heri Hoerudin atas bantuan teknisnya dan semua pihak yang telah membantu selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Chotpitayasunondh, T., K. Ungehusak, W. Hanshaworakul, S. Chunsuthiwat, & P. Sawanpanyalert. 2005. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand. 2004. *Emerging Infect. Dis.* 11: 201-209.
- Dharmayanti, NLPI, R. Damayanti, A.Wiyono, R. Indriani, & Darminto. 2004. Identifikasi virus avian influenza virus isolat Indonesia dengan metode reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *JITV.* 9 (2): 136-143
- Dharmayanti, Indriani, & Darminto. 2007. Dinamika virus Avian Influenza setelah 3 tahun bersirkulasi di Indonesia. Laporan akhir penelitian tahun 2006. Bbalitvet. Bogor

- Dharmayanti, NLP.I, & R. Indriani. 2007. Patogenesisitas molekuler virus avian influenza yang diisolasi pada tahun 2005. *Media Kedokteran Hewan*. 232 : 68-73
- Fouchier, RAM, V.Munster, A.Wallens-ten, TM.Bestebroer, S.Herfst, D.Smith, GF. Rimmelz-waan, B.Olsen, & ADME. Osterhaus. 2005. Characterization of novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J.Virol*. 79 (5): 2814-2822
- Guan, Y., LLM.Poon, CY. Cheung, T.M.Ellis, W.Lim, AS.Lipatov, KH Chan, KM. Strum-Ramirez, CL.Cheung, YHC.Leung, KY. Yuen, R.G.Webster, & JSM. Peiris. 2004. H5N1 influenza: A protean pandemic threat. *Proc.Natl.Acad. Sci*. 102 (21): 8156-8161
- Ha, Y., DJ. Stevens, JJ. Skehel, & DC.Wiley. 2001. X-Ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc.Natl.Acad.Sci*. 98 : 11181-11186
- Harimoto, T, & Y. Kawaoka. 2006. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends in Molecular Medicine*. 12 (11) : 506-514
- Hien, TT., M. de Jong, & J. Farrar. 2004. Avian influenza : a challenge to global health care structures. *N. Engl. J. Med*. 351: 2363-2365.
- Lee, MS., PC.chang, JH.Shien, MC. Cheng, & HP.Shieh. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *J.Virol. Methods*. 97: 13-22.
- Li, KS., Y. Guan, J. Wang, GJD. Smith, KM. Xu, L. Duan, AP. Ronohardjo, P. Puthavathana, C.Buranathai, TD.Nguyen, A.T.Estoepangestie, AC. haisingh, P. Auewarakul, HT. Long, NT. Hanh, RJ. Webby, LLM. Poon, H. Chen, KF. Shortridge, KY. Yuen, RG. Webster, & JSM. Peiris. 2004. Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 340 : 209-213.
- Puthavathana, P., P. Auewarakul, PC. Charoenying, K. Sangsiriwut, P. Pooruk, K.Boonnak, R.Khanyok, P. Thawachsupa, R. Kijphati, & P.Sawanpanyalert. 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J.Gen Virol*. 86 : 423-433
- Senne, DA., B. Panigrahy, Y. Kawaoka, JE. Pearson, J. Suss, M. Lipkind, H. Kida, & RG. Webster. 1996. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses : amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis*. 40 : 425-437
- Smith, GJD., TSP. Naipospos, TD. Nguyen, MD. de Jong, D. Vijaykrishna, TB. Usman, SS. Hassa, TV. Nguyen, TV. Dao, NA. Bui, YHC. Leung, CL. Cheung, JM. Rayner, JX. Zhang, LJ. Zhang, LLM. Poon, KS. Li, VC. Nguyen,

- TT. Hien, J. Farrar, RG. Webster, H. Chen, JSM Peiris, & Y. Guan. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human inangs in Indonesia and Vietnam. *Virology*. 350 : 258-268
- Swayne, DE. 2007. Overview of avian influenza vaccine and vaccination. Dalam: *International avian influenza vaccination seminar*. Jakarta, 11-12 Juni 2007
- World Health Organization, 2005. Global influenza program surveillance network, 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerging Infect.Dis.* 11 : 1515-1521
- Wiyono, A, R. Indriani, NLPI. Dharmayanti, R. Damayanti, & Darminto. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Virus Highly Pathogenic Avian Influenza subtype H5 dari ayam asal Wabah di Indonesia. *JITV*. 9 (1) : 61-71
- Wright, PF, & Webster, RG. 2001. Orthomyxoviruses; In *Fields Virology* (4th ed) : 1533-1579. Lippincott-Raven